Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Eberhard Wecker

Untersuchungen zur Eignung von menschlichen Tonsillenkulturen zum Nachweis des T-cell replacing factors

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Werner Merkle

aus Wolnzach

Hannover, den 15. Februar 1982

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Eberhard Wecker

Untersuchungen zur Eignung von menschlichen Tonsillenkulturen zum Nachweis des T-cell replacing factors

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Werner Merkle

aus Wolnzach

Hannover, den 15. Februar 1982

Referent: Prof. Dr. med. Eberhard Wecker

Korreferent: Prof. Dr. med. Peter Emmerling

Dekan: Prof. Dr. med. Karl-August Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Ich möchte gerne danken
jeder und jedem für ihre Zeit
und das Geschenk ihrer Person

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0100

Seite

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1
Geräte und Material 3
Methoden
1. Bereitung der Zellsuspension 8
2. Zelltrennungen
2.1. Trennung durch spontane Rosettenbildung menschlicher T-Zellen mit Schaferythrozyten 9
2.2. Elimination von T-Zellen mit einem spezifischen Antiserum gegen menschliche T-Zellen 1o
2.3. Makrophagen-Verarmung durch Inkubation in Plastikflaschen 1o
2.4. Teilelimination von Makrophagen und T-Suppressor-Zellen über Sephadex G 1o - Säulen 11
3. Herstellung von TRF-haltigen Überständen
3.1. Concanavalin A - induzierte Überstände 11
3.2. Allogen stimulierte Überstände 11
4. Zellkulturen
4.1. Mikrokulturen zur Messung des ^{3}H-Thymidineinbaues verursacht durch Mitogenstimulation 12
4.2. Zellkulturen nach Dosch und Gelfand 13
5. Hämolytischer Plaquetest als Nachweis von Antikörper-produzierenden Plasmazellen 13
Ergebnisse
1. Röhrchenkulturen 15
2. Mikrokulturen zur Messung des ^{3}H-Thymidineinbaues verursacht durch Mitogenstimulation 19
2.1. Elimination von T-Zellen mit einem spezifischen Antiserum gegen menschliche T-Zellen 22
2.2. Abtrennung von T-Lymphozyten durch spontane Rosettenbildung mit Schaferythrozyten 24

Seite

Diskussion 3o
Zusammenfassung 4o
Literaturverzeichnis 41

EINLEITUNG

Lymphozyten sind die Träger der körpereigenen Abwehr der Vertebraten. Ihre Population läßt sich unterscheiden in sogenannte T-Lymphozyten (T als Abkürzung für Thymus, in dem sie ihre entscheidende Prägung erfahren) und B-Lymphozyten (B für bursa fabrici, einem Organ im Darmbereich der Vögel, bzw. einem analogen, noch nicht sicher identifizierten Ort bei anderen Vertebraten, in dem B-Lymphozyten ihre Charakteristik erhalten). B-Lymphozyten werden nach Antigen-Kontakt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Bei einer Reihe von Antigenen nun benötigen B-Zellen, um Plasmazellen zu werden, die Hilfe einer Subpopulation der T-Zellen, der sogenannten T-Helfer-Zellen. Schimpl und Wecker wiesen im nu/nu-Maussystem nach, daß T-Helferzellen einen antigenunspezifischen Faktor produzieren, der die T-Zell-Funktion ersetzen kann, der von ihnen so genannte T-cell replacing factor (TRF)(5, 6). Dieser Faktor gibt das letzte Signal für bereits proliferiert habende B-Zellen, das sie zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen macht (7). Schimpl und Wecker wiesen den T-cell replacing factor im Maussystem nach. In einer weiteren Arbeit ging es darum, die TRF-Wirkung im Humansystem nachzuweisen (21). Dazu wurden Tonsillenzellen verwendet. Die Tonsillen stammten von 3-7 jährigen Kindern, die nach medizinischer Indikation tonsillektomiert worden waren. Die Problematik dieser Versuche lag darin, daß bei jedem Versuch andere Tonsillen verwendet wurden. Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Der hemmende Einfluß schien auf die sogenannten Suppressor-T-Zellen zurückzuführen zu sein. T-Suppressor-Zellen wirken entweder auf T-Helfer-Zellen oder auf B-Zellen und unterdrücken so die Antikörper-Synthese.

Es sollte nun versucht werden, die hemmenden Faktoren zu eliminieren, um ein reproduzierbares Versuchssystem mit humanen Tonsillenzellen zu errichten, in dem der Nachweis des T-cell replacing factors geführt werden konnte.

GERÄTE

Plastikwaren

Falcon Plastics, Oxnard, California, USA
Pipetten 1, 5, 1o ml (Kat. Nr. 7521 F, 7543 F, 7551 F)
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15ml, 5o ml (Kat. Nr. 2o95, 2o7o)
Kulturröhrchen 16 x 125 mm (Kat. Nr. 3oo2)
Petrischalen Ø 6o mm (Kat. Nr. 3oo2)

Nunc, Dänemark
Kulturflaschen 3o, 5o, 8oo ml

Costar, Cambridge, Mass., USA
Kulturflaschen 25o ml (Kat. Nr. 3o75)

Greiner, Nürtingen
Mikrotiterplatten, U-Form (M 22o - 24 Art.)

Glaswaren

Zentrifugenröhrchen aus Glas, konisch 16 x 1oo mm
Glaspipetten 1o ml
Erlmeyer-Kölbchen

Sterilfilter

Millipore GmbH, Neu-Isenburg

Kühlzentrifuge

Universal Junior II KS (Marin Christ, Osterrode/Harz)

Brutschrank

Ehret GmbH, Emmendingen

Zell-Erntegerät

Titerek (A.S. Skartrion, für Flow Laboratories, Bonn)

Coulter Counter

Coulter Electronics Ltd., Dunstable, England

Szintillationszähler

TriCarb 3375 (Packard Instruments, Frankfurt/M)

MATERIAL

Tonsillen

aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität Würzburg. Exstirpiert von Kindern, die im Alter von 3-7 Jahren tonsillektomiert wurden.

Medium RPMI 1640 (Mediapharm, Aschaffenburg)

je 100 ml wurden ergänzt mit:

1 ml 200 mM L-Glutamin (Puriss., Fluka AG, Schweiz)

1 ml 100 mM Natriumpyruvat (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA)

1 ml 100 x konzentrierten nicht-essentiellen Aminosäuren (Microbiol. Assoc.)

5×10^3 I.E. Moronal (Heyden, Michigan)

2×10^4 I.E. Streptomycinsulfat (Bayer Leverkusen)

2×10^4 I.E. Penicillin G (Bayer Leverkusen)

1 ml einer 5×10^{-3} -molaren 2-Mercaptoäthanol-Lösung (Serva, Heidelberg) in BSS

2,5 ml einer 5,6 %-igen $NaHCo_3$-Lösung.

Puffer

BSS (Balanced Salt Solution) nach Mishell und Dutton

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) nach Dulbecco und Vogt

Lymphozyten-Trennmedium

Dichte 1,077 g/cm^3 (Mediapharm)

Lösungen

Tryptic Soybroth (Soybean Casein Digest Medium USP XVIII, Dry Form, Gibco Diagnostics, Madison, Wisconsin, USA): 3 %-Lösung in physiol. Kochsalz

Agarose (Behringwerke Marburg):

o,o5 %-ige Lösung in destilliertem Wasser, bei 4^{o} C gelagert

o,5 %-ige Lösung in BSS frisch hergestellt

^{3}H-Thymidin (New England Nuclear, Boston, USA)

5,o mCi in 5 ml sterilem Wasser

Scintillationslösung

5o g POPOP (1,4-Bis-2(4-Methyl-5-Phenyloxazylol)-Benzol und 4 g PPO (2,5-Di-Phenoxezol), in 1 l Toluol p.A. angesetzt (Hersteller: Koch Light Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, England)

Seren

Humanserum AB-Pool Rh pos.

hitzeinaktiviert (bei 56^{o} C, 6o Min.), geliefert vom Bayer. Roten Kreuz, Wiesentheid.

Spezifisches Antiserum gegen menschliche T-Zellen

Fötales Kälberserum (FCS)

(Gibco-Bio-Cult Laboratories, Glasgow, Schottland)

hitzeinaktiviert für 3o min. bei 56^{o} C.

Kaninchenserum als Komplement

Neuraminidase

Neuraminidase 4761 NEUA (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey)

Mitogene

Concanavalin A = Con A

(Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Pokeweed Mitogen = PWM

(Seromed, München)

Phytohämagglutinin = PHA

METHODEN

1. Bereitung der Zellsuspension aus menschlichen Tonsillen

Die von 3-7-jährigen Kindern stammenden Tonsillen wurden nach der Exstirpation in Erlenmeyer Kolben gegeben, die mit 5o ml sterilem BSS, sowie einem Antibiotikazusatz gefüllt waren. Nach steriler Abdeckung wurden sie bis zur Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Verarbeitung geschah innerhalb von 2 Stunden nach Überbringung: Unter sterilen Bedingungen wurde jede Tonsille in einer mit BSS gefüllten Petrischale (6o mm) gespült und in einer zweiten, ebenfalls mit BSS gefüllten Petrischale mit Hilfe einer Schere von nekrotischen und sklerosierten Bezirken befreit und in einer dritten, wiederum mit BSS gefüllten Petrischale durch ein Sieb gerieben, bis nur noch bindegewebige Reste übrigblieben. Der Inhalt der Petrischale kam in ein 5o ml Falcon Plastik-Röhrchen und wurde mit BSS auf 5o ml aufgefüllt. Anschließend stellte man das Zentrifugenröhrchen für 1o Minuten auf Eis, um den Detritus absetzen zu lassen. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette in ein gleiches Zentrifugenröhrchen überbracht und mit sterilem BSS auf 5o ml aufgefüllt. Anschließende Zentrifugation für zehn Minuten bei 4^{o} C mit 167 g. Daraufhin wurde wiederum der Überstand verworfen, das Röhrchen mit BSS auf 2o ml gebracht und der Inhalt mit Hilfe einer Pasteurpipette gemischt. In ein weiteres Falcon Röhrchen kamen nun 1o ml eines Lymphozyten-Trennmediums (LSM), das vorsichtig mit den 2o ml des suspendierten Zellsedimentes überschichtet wurde. Durch das Trennmedium erfolgte die Abtrennung der Erythrozyten und toten Lymphozyten von den lebenden Lymphozyten, die in der Interphase zwischen LSM und BSS eine Bande bildeten. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation bei 267 g, bzw. bei 3oo g für 3o Minuten in der Kälte. Die Bande an der Interphase zwischen LSM und BSS wurde mit einer Pasteurpipette vor-

sichtig abgehoben und mit BSS dreimal bei 167 g für 1o Minuten und bei 4^{o} C gewaschen. Das Zellsediment wurde sodann mit ergänztem RPMI 164o auf 3o ml aufgefüllt, sorgfältig mit einer Pasteurpipette gemischt und 2o Mikroliter dieser Suspension über den Coulter-Counter gezählt. Entsprechend der Weiterbearbeitung stellte man dann die benötigte Zellzahl ein.

2. Zelltrennungen

2.1. Trennung durch spontane Rosettenbildung menschlicher T-Zellen mit Schaferythrozyten (4)

Schaferythrozyten wurden aus der Alsever's Lösung entnommen und dreimal mit Kalzium-physiologischer Kochsalzlösung (Ca.P.S.) gewaschen (5og, 4^{o} C, 1o min.). Dann suspendierte man 1 ml gepacktes SRBC-Sediment in 1 ml Ca.P.S., das mit o,3 U Neuraminidase versetzt war. Folgend Inkubation für 3o Minuten bei 37^{o} C. Die SRBC wurden dann dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (bei 65o g, 4^{o} C und für 1o Minuten) und auf $2 \times 1o^{8}$ Zellen/ml eingestellt. Eine Lymphozytensuspension mit einer Zelldichte von $2 \times 1o^{6}$/ml wurde nun mit der auf $2 \times 1o^{8}$ Zellen/ml eingestellten SRBC-Suspension im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 Minuten bei 37^{o} C inkubiert. Sodann zentrifugierte man für 5 Minuten bei 42o g und 4^{o} C und stellte für 15 Minuten auf Eis. Anschließend vorsichtiges Resuspendieren mit einer Pipette, um die gebildeten Rosetten nicht zu zerstören. Nun inkubierte man erneut für 5 Minuten bei 37^{o} C, zentrifugierte für 5 Minuten in der Kälte und stellte das Sediment für 45 Minuten auf Eis. Vom Überstand wurde schließlich jeweils soviel abgehoben, daß nur noch 25 ml im Zentrifugenröhrchen verblieben. Das Sediment wurde nochmals vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert und dann mit LSM unterschichtet. Zur Trennung zentrifugierte man bei

42o g, 4^{o} C für 3o Minuten. In der Interphase verblieben die nicht-rosettierten Zellen. Diese Bande wurde abgehoben und dreimal in BSS für 1o Minuten mit 24o g in der Kälte gewaschen.
Die gewonnen Zellen kamen in ergänztes RPMI 164o - Medium.

2.2. Elimination von T-Zellen mit einem spezifischen Antiserum gegen menschliche T-Zellen

Diese Methode wurde mit ungetrennten Lymphozyten durchgeführt. Man ging folgendermaßen vor: Auf 1 x $1o^{7}$ Zellen wurden 2 ml eines 1:5, bzw. 1:2o verdünnten Anti-Human-T-Zell-Serums gegeben und für 3o Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in BSS gewaschen und das Sediment in 1 ml eines 1:5 verdünnten Komplements suspendiert. Diese Suspension wurde für 45 Minuten bei 37^{o} C inkubiert, zweimal in BSS gewaschen und anschließend in RPMI aufgenommen.

2.3. Makrophagen-Verarmung durch Inkubation in Plastikflaschen

Tonsillenzellen wurden in angereichertem RPMI 164o zuzüglich 1o % fötalem Kälberserum auf eine Zelldichte von 1 x $1o^{7}$/ml gebracht und in Plastikkulturflaschen gegeben. Die nur lose verschlossenen Kulturflaschen kamen in einen Brutschrank und wurden über Nacht bei 37^{o} C mit CO_2 begast. Da Makrophagen eine starke Haftfähigkeit an Plastikwaren besitzen, blieben sie an den Wänden der Kulturflaschen hängen. Auf diese Weise war es möglich, die Tonsillenzellen zum großen Teil von Makrophagen zu befreien.

2.4. Teilelimination von Makrophagen und T-Suppressor-Zellen über Sephadex G 10 - Säulen

In eine sterile 20 ml-Spritze kamen 12 ml steriles Sephadex G 10, nachdem vorher 4 g Glasperlen eingefüllt worden waren, sowie 10 ml BSS. Nun wurde das BSS durch den unten angebrachten Silikonschlauch mit Klammer abgelassen und erneut ca. 80 ml BSS nachgegossen. Nachdem dieses BSS fast durchgelaufen war, wurde durch Rühren des Sephadex seine Oberfläche geebnet. Anschließend konnte man die Zellen auftragen (ca. 1,5 - 2 x 10^8 Zellen pro 20 ml-Spritze). Während des Durchlaufs mußten ständig kleine Mengen an BSS zugegeben werden. Man sammelte den Durchlauf, bis das BSS klar war und hatte nun angereicherte B- und T-Helfer-Lymphozyten.

3. Herstellung von TRF-haltigen Überständen

3.1. Concanavalin A - induzierte Überstände

In RPMI aufgenommene Zellen wurden auf 1 x 10^7/ml eingestellt und mit 1 % fötalem Kälberserum angereichert. Dazu gab man 2,5 Mikrogramm Con A/ml und begaste in einer feuchten Kammer bei 37^0 C für 24 Stunden in Plastikschälchen. Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation von den Zellen befreit, steril filtriert und bis zur Verwendung bei -70^0 C eingefroren.

3.2. Allogen stimulierte Überstände

Jeweils 5 ml einer auf 1 x 10^7 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension einer Tonsille wurden mit 5 ml einer auf 1 x 10^7 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension einer anderen, nicht histokompatiblen Tonsille gemischt und ebenso behandelt wie die Con A - stimulierten Zellsuspensionen.

4. Zellkulturen

4.1. Mikrokulturen zur Messung des ^{3}H-Thymidineinbaues verursacht durch Mitogenstimulation

Eine Zellsuspension wurde wie oben beschrieben hergestellt und in RPMI, angereichert durch 5 %, bzw. 1o % Humanserum (AB-Pool) auf 1 x $1o^{6}$ Zellen/ml eingestellt. o,1 ml dieser Suspension kam in je einen Napf einer Mikrotiterplatte. Gemessen wurden jeweils drei Parallelansätze, drei Näpfe pro Tonsille dienten als Kontrolle und wurden nur mit Zellen, nicht aber mit Mitogen eingesät.
Zur Austestung kam die stimulierende Wirkung der Mitogene Phytohämagglutinin (PHA), Pokeweed Mitogen (PWM), sowie Concanavalin A (Con A). Die Mitogene wurden in einer Verdünnungsreihe gegeben, um die optimale Dosis für jede Tonsille zu ermitteln. Man inkubierte die Zellen in einer feuchten Kammer bei Begasung mit 5 % CO_2 und einer Temperatur von 37^{o} C für vier, fünf oder sechs Tage, um den Zeitpunkt der höchsten Stimulierbarkeit zu finden. Am Tag der Ernte (-vier, fünf bzw. sechs Tage nach der Einsaat-) versetzte man jeden Napf mit 2o Mikrolitern einer ^{3}H-Thymidinlösung in RPMI (o,2 Mikrocurie/2o Mikroliter) und inkubierte für weitere 4 Stunden auf dieselbe Weise wie vorher genannt. Anschließend wurden die Zellen geerntet mit Hilfe des Zellharvesters. Die Zellen wurden damit auf Glasfilter gespült und daraufhin mit Wasser lysiert. Dabei verblieb die DNA der Zellkerne mit dem jeweils eingebauten ^{3}H-Thymidin auf dem Filter, während das nicht inkorporierte radioaktive Thymidin durch den Vorgang weggewaschen wurde. Man trocknete nun die Filter bei $8o^{o}$ C. Folgend kamen die je einzelnen Filterpartikel mit den auf ihnen haftenden DNA-Molekülen in Szintillations-Zählröhrchen mit je 5 ml POPOP/POP und wurden im Szintillationszähler gezählt. Zur Beur-

teilung der Stimulationswirkung verwendete man den Mittelwert aus den je drei gleichen Kulturen. Der Stimulationsindex schließlich gibt das Zahlenverhältnis zwischen stimulierten und unstimulierten Kulturen.

4.2. Zellkulturen nach Dosch und Gelfand (1)

Verwendet wurden Plastikröhrchen (16 x 125 mm). Gesamtvolumen der Kulturen waren jeweils 5 ml, bestehend aus Kulturmedium RPMI 1640 (angereichert mit 1 % Tryptic Soybroth und 5 % Humanserum). Darin wurden eingesät 5 x 10^6 Tonsillenzellen, sowie 50 Mikroliter einer SRBC-Antigen-Suspension (mit 1 x 10^7 bis 2,5 x 10^8 Zellen pro ml). Später wurden dann noch TRF-haltige Überstände verwendet, sowie Pferdeerythrozyten als Antigen. Die Kulturen wurden für 5 - 7 Tage inkubiert (bei 37° C in einem mit 5 % CO_2 begasten Brutschrank) in aufrechter Stellung mit losem Kappenverschluß. Doppelansatz pro Kultur.

5. Hämolytischer Plaquetest als Nachweis von Antikörper-produzierenden Plasmazellen (2)

Als Vorbereitung beschichtete man Objektträger mit 0,05 %iger Agarose und ließ diese trocknen. Die Kulturröhrchen mit den Zellen wurden bei 167 g in der Kälte für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Dann vereinigte man die je zwei identisch angelegten Kulturen und zentrifugierte ein zweites Mal auf dieselbe Weise, verwarf den Überstand erneut und füllte mit 1 ml BSS auf. Die Zellen kamen nun auf Eis. In der Zwischenzeit wurde eine 0,5 %ige Agarose-Lösung durch Kochen hergestellt und in einem Wasserbad bei 44° C gehalten. Man pipettierte nun in im

selben Wasserbad stehende Reagenzgläser: 0,5 ml Agarose, 0,1 ml der Zellsuspension, sowie 0,05 ml einer 7 %igen Schaf- bzw. Pferdeerythrozytensuspension. Die Testsuspension wurde nun durch Schütteln gemischt und auf je einen Objektträger ausgegossen. Pro Einzelkultur wurden zwei Objektträger beschichtet. Sobald die Agarose sich verfestigt hatte, kamen die Objektträger in eine feuchte Kammer, wurden mit Komplement beschichtet und schließlich für vier Stunden bei 37^{0} C inkubiert. Nach der Inkubationszeit zählte man die Zahl der Lysishöfe auf den jeweiligen Objektträgern. Aus der Zellsuspension bestimmte man vorher mit dem Coulter-Counter die Zellzahl jeder Kultur. Die Zahl der Zellen, die Antikörper gegen die gegebenen Antigene bildeten, wird als Zahl der Plaque-bildenden Zellen pro 10^{6} Zellen bezeichnet.

ERGEBNISSE

Zellausbeute: nach der LSM-Trennung und dreimaliger BSS-Waschung ergaben die verschiedenen Tonsillenpaare zwischen $1,5 \times 10^8$ und 5×10^8 Zellen. Nach Glöckner (21) hatte jedes von ihm verwendete Tonsillenpaar vor der Trennung mit LSM im Mittel $14,8 \times 10^8$ Zellen. Damit würden durch die Trennung zwischen 65 und 90 % der Zellen verlorengehen, wobei man nicht sagen kann, ob es sich dabei hauptsächlich um tote Zellen oder um solche aus der Interphase nicht abgehobene handelte.

1. Röhrchenkulturen

Die von Dosch und Gelfand (1) beschriebenen Röhrchenkulturen wurden als erstes angelegt. Dabei kamen 5×10^6 Tonsillenzellen in 5 ml ergänztem RPMI 1640 einschließlich 5 % AB-Pool in ein Röhrchen. Als Antigen dienten Schaferythrozyten, von denen 5×10^7/Kultur, sowie 2×10^6/Kultur zugegeben wurden. Ein Ansatz war ohne Zellen aber mit Antigen, ein weiterer mit Zellen aber ohne Antigen - beide zur Kontrolle.
Zwei verschiedene Humanseren wurden verwendet (AB-Pool A und AB-Pool B). Die Austestung erfolgte am 6. Tag. Dabei fand sich, daß nur die Kulturen mit dem AB-Pool A eine antigenabhängige Reaktion zeigten (bei beiden Parallelansätzen wurden dieselben Tonsillenzellen verwendet). (Tabelle 1).
Die Kulturen mit AB-Pool B zeigten Plaques bei den Ansätzen ohne Zellen, sogenannte Pseudoplaques, die zwar ähnlich aussehen wie sonstige Plaques, denen aber die Antikörper-sezernierende Zentralzelle fehlt, die normalerweise im Zentrum des Lysishofes zu finden ist. (3)
Damit stellte sich die Frage nach der Eignung von verschiedenen

Tabelle 1

Plaque-bildende Zellen bei Stimulation von Röhrchenkulturen mit Zusatz von Humanserum durch verschiedene Dosen von SRBC

Austestung am 6. Tag nach Kulturansatz

Antigen	PBZ/Kultur
5×10^7 SRBC/Kultur	48
1×10^7 SRBC/Kultur	27
2×10^6 SRBC/Kultur	1

Humanseren für die Röhrchenkulturen.
Beim nächsten Versuchsansatz verwendete man vier verschiedene Humanseren (AB-Pool A, B, C, D). In einem Parallelansatz wurden Pferdeerythrozyten anstelle von Schaferythrozyten als Antigen verwendet. Die Austestung ergab, daß AB-Pool A wiederum Plaques entstehen ließ, AB-Pool B ergab weder Plaques noch Pseudoplaques, AB-Pool C und D ließen sowohl Plaques als auch Pseudoplaques entstehen (sowohl im antigenfreien, als auch im lymphozytenfreien Ansatz). Damit zeigte sich die Abhängigkeit des Versuchsausganges vom verwendeten Serum noch deutlicher.
Bei den Ansätzen mit den Pferdeerythrozyten als Antigen ergab nur AB-Pool A Plaques. Die Anzahl der Plaques betrug allerdings nur ein Drittel im Vergleich zu dem Ansatz mit Schaferythrozyten.
Nun wurde untersucht, ob die blockierende Wirkung des AB-Pools B von der zugegebenen Dosis abhing. Zu den einzelnen Versuchsansätzen verwendete man jeweils 5 %, 1o %, 15 % und 2o % AB-Pool B. Zum Vergleich wurde auch fötales Kälberserum in denselben Konzentrationen untersucht. Die Austestung erfolgte am 6., 7. und 8. Tag nach Kulturbeginn. Als Ergebnis zeigten sich vereinzelte Plaques an verschiedenen Tagen und bei verschiedenen Serumkonzentrationen. Weder eine Antigenabhängigkeit, noch eine Abhängigkeit von der Serumkonzentration war feststellbar. Die Ansätze mit fötalem Kälberserum ergaben nur je einen Plaque am 7. Austestungstag.
Diese Ansätze schienen darauf hinzudeuten, daß der Kulturerfolg nicht von der Serumkonzentration abhing, sondern vom verwendeten Serum selbst, bzw. irgendwelchen Hemmfaktoren in den Tonsillenzellen.
Ein weiterer Versuch stellte die Frage nach der Bedeutung der Anzahl der Lymphozyten in der Kultur. Eingesetzt wurden je Kulturansatz jeweils $1 \times 1o^6$ Zellen/ml, $2 \times 1o^5$ und $4 \times 1o^4$. Als Serum wurde AB-Pool A (5 %) verwendet, sowie fötales Kälberserum (2o %). Zu einer Kulturreihe mit identischen Bedingungen wurde am 4. Tag

TRF zugesetzt.
Bei diesem Versuch ergab die Austestung am 6. Tag nach Ansatz Pseudoplaques bei dem bisher funktionierenden Serum, sowohl bei der Versuchsreihe ohne TRF, als auch bei der Versuchsreihe mit TRF. Dasselbe Tonsillenpaar zeigte mit fötalem Kälberserum keinerlei Plaques, eine weitere getestete Tonsille bei Zusatz von fötalem Kälberserum und einer eingesetzten Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro Kultur einige Plaques.
Bei einer Wiederholung desselben Versuches unter identischen Bedingungen und einem anderen Tonsillenpaar konnten bis auf vereinzelte keinerlei Plaques nachgewiesen werden.
Auch ein Versuch, bei dem T-Lymphozyten und Makrophagen über eine Sephadex G-10 Säule abgetrennt wurden, zeigte kein Ergebnis.

Damit war der Versuch, ein reproduzierbares, antigenabhängiges System mit Plaque-produzierenden Tonsillenzellen zu errichten gescheitert. Es zeigte sich somit, daß die Problematik des Tonsillensystems nicht nur in der blockierenden Wirkung der Suppressorzellen zu suchen war, sondern daß zuerst ein Serum gefunden werden mußte, in dem die Immunreaktion ablaufen konnte. Erst dann konnte die nicht-serumabhängige Hemmreaktion untersucht werden.

2. Mikrokulturen zur Messung des ^{3}H-Thymidineinbaues verursacht durch Mitogenstimulation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, reine B-Zellkulturen herzustellen, um sodann die Wirkung des T-cell replacing factors an diesen reinen B-Zell-Kulturen zu demonstrieren. Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, daß ungetrennte Tonsillenkulturen, die mit Schaferythrozyten zur Antikörperproduktion angeregt wurden, keinerlei reproduzierbare Ergebnisse brachten. Dafür kamen zwei Gründe in Betracht: einerseits die in den Kulturen verwendeten Humanseren oder die in den Zellkulturen enthaltenen T-Suppressor-Zellen.

Zur Umgehung dieser Hindernisse legte man nun zunächst Mikrokulturen an, die mit Mitogen stimuliert wurden. Als nächstes sollte dann die Abtrennung der T-Suppressor-Zellen versucht werden.

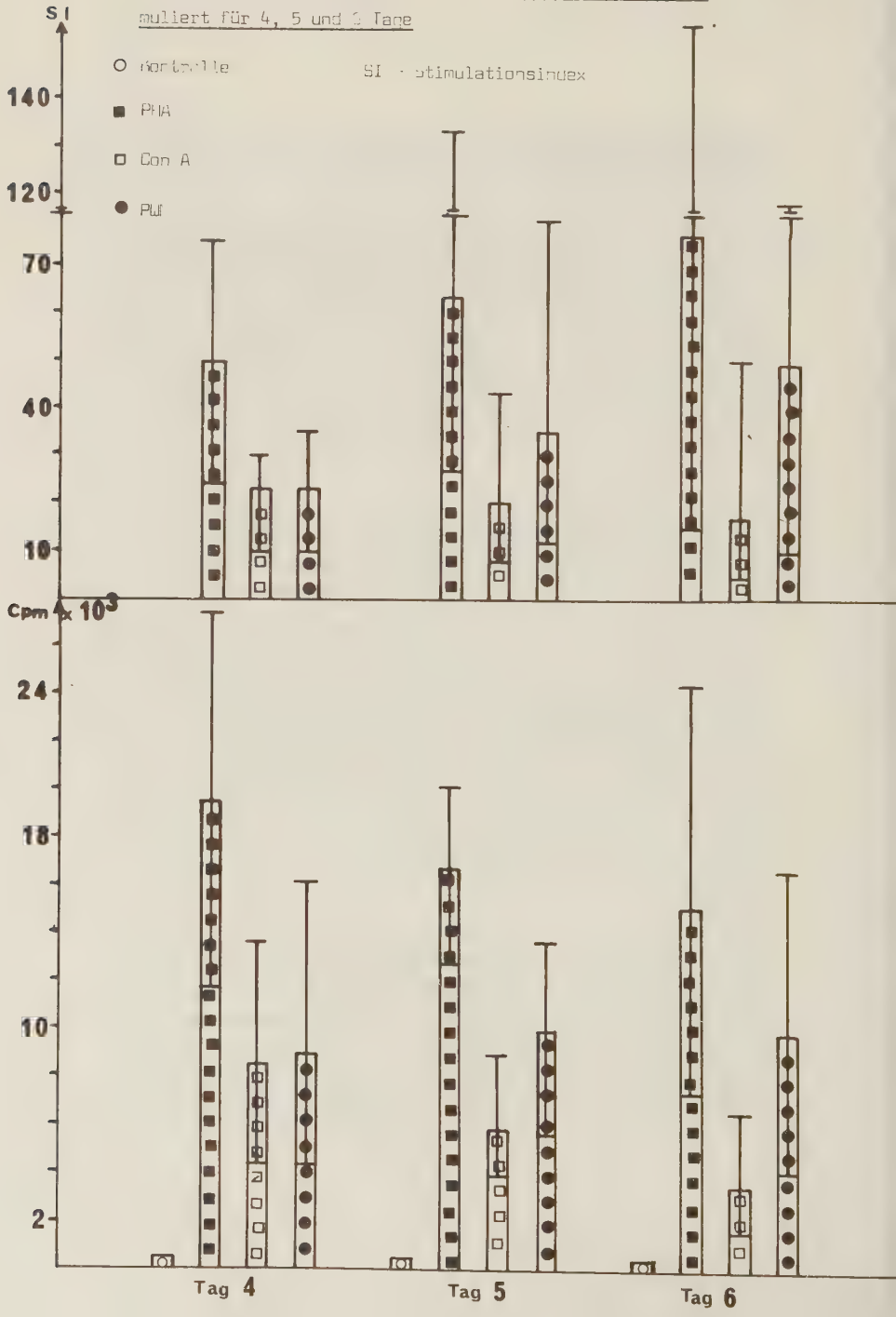
Mitogene wirken im Gegensatz zu Antigenen polyklonal, d.h. sie bringen Lymphozyten antigen-unspezifisch zur Proliferation. Eingesetzt wurden die Mitogene Concanavalin A (Con A), Phytohämagglutinin (PHA), sowie Pokeweed Mitogen (PWM), in jeweils verschiedenen Konzentrationen pro Kultur. (Siehe Methoden).

Fast alle der getesteten Tonsillenzellpopulationen erwiesen sich als stimulierbar. Zuerst wurden einige Tonsillenpaare nach ihrem zeitlichen Stimulationsverhalten überprüft. Der ^{3}H-Thymidineinbau wurde am 4., 5., sowie 6. Tag nach Kulturansatz gemessen. (Bemerkenswerterweise hatte das verwendete Humanserum keinen blockierenden Effekt!).

In Abbildung 1, die die Ergebnisse von sechs stimulierten Tonsillenpaaren zusammenfaßt, läßt sich Folgendes erkennen: PHA führte in allen 6 Versuchen zusammengefaßt und jeweils einzeln betrachtet zum größten Thymidineinbau. Der höchste Wert wurde am 4. Tag nach Kulturbeginn erreicht. Nach dem 4. Tag sank es nahezu linear ab, um am 6. Tag bei etwa 75 % des Wertes des 4. Tages zu stehen. Der Stimulationsindex verhielt sich umgekehrt. Er stieg von 5o

Abbildung 1

Ungetrennte Tonsillenzellen, mit PHA, Con A und PWM stimuliert für 4, 5 und 6 Tage



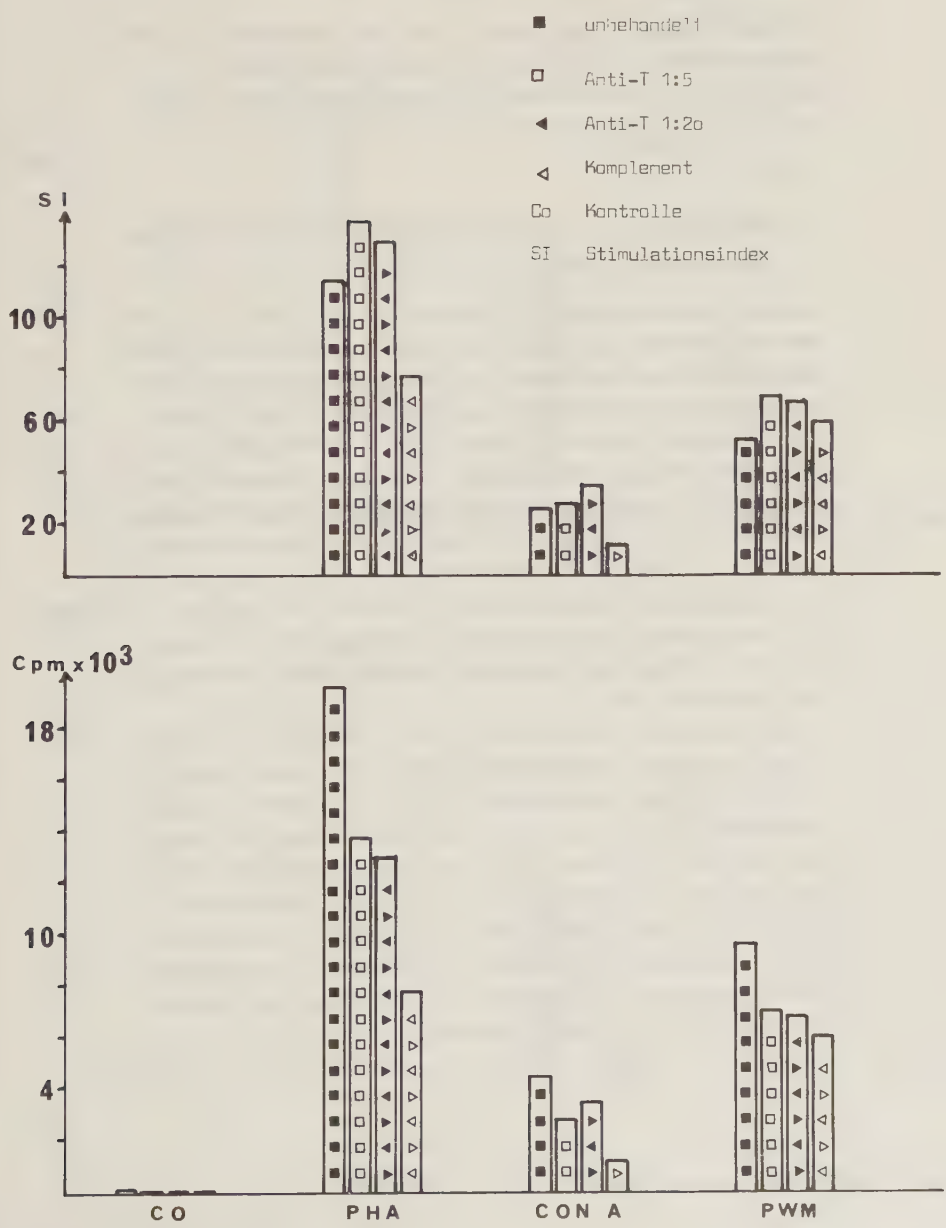
durchschnittlich am 4. Tag über 63 am 5. Tag auf 76 am 6. Tag. D.h. obwohl der ^{3}H-Thymidineinbau insgesamt nachließ, stieg das Verhältnis stimuliert : unstimuliert vom vierten auf den sechsten Tag an. Vielleicht war dies zurückzuführen auf eine Verschlechterung des Kulturmediums.
Con A führte zu einem Thymidineinbau, der im Durchschnitt nur knapp die Hälfte des PHA-Wertes erreichte. Die höchste Stimulierbarkeit hatten die Zellen bei Concanavalin A am 4. Tag, diese sank bis zum 6. Tag auf knapp die Hälfte des Maximums am 4. Tag ab.
Im Gegensatz zu PHA fiel der Stimulationsindex ebenfalls vom 4. auf den sechsten Tag ab. Er lag bei 23 am 4. Tag, bei 2o am 5. Tag und bei 17 am 6. Tag.
Pokeweed Mitogen stimulierte die Zellen am 4. Tag ebenso hoch wie Con A, stieg aber am 5. Tag noch an, erreichte damit den höchsten Thymidineinbau und blieb am 6. Tag knapp auf derselben Höhe. Betrachtet man den Stimulationsindex, so lag er am 4. Tag (wie Con A) bei 22, stieg aber am 5. Tag auf 35 und erreichte seinen höchsten Wert am 6. Tag mit 49.

Mit diesen Versuchen war gezeigt, daß Humanserum zumindest die polyklonale Proliferation von Tonsillenzellen generell nicht behindert. Vermutlich dürfte es auch die antigengetriebene Proliferation und Differenzierung der B-Zellen erst in einem späteren Zeitpunkt - zwischen Proliferation und Antikörper-Sezernierung - blockieren.
Nach dem Nachweis, daß Tonsillenzellen fast generell von den Mitogenen PHA, Con A und PWM zur Proliferation gebracht werden, konnte nun versucht werden, T-Lymphozyten durch verschiedene Methoden abzutrennen und das Stimulationsverhalten der ungetrennten Lymphozyten mit denen zu vergleichen, die verschiedenen Trennverfahren unterworfen worden waren.

2.1. Elimination von T-Zellen mit einem spezifischen Antiserum gegen menschliche T-Zellen

Als nächster Schritt wurde versucht, T-Lymphozyten zu entfernen. Das geschah zunächst durch Anwendung des Anti-T-Zell-Serums (siehe Methoden). Zum Vergleich wurden parallel Zellen derselben Tonsillen untersucht, die nicht mit dem Anti-T-Zellserum versehen worden waren, sowie solche, die mit Komplement versehen worden waren. Das Anti-T-Zellserum wurde in zwei Verdünnungen, nämlich 1:5 und 1:2o verwendet. Am 5. Tag nach Versuchsansatz zeigte sich folgendes Ergebnis (siehe Abbildung 2): der Kontrollansatz mit intakten T-Lymphozyten führte mit PHA zum höchsten ^{3}H-Thymidineinbau, mit PWM zu einem etwa halb so hohen, mit Con A ungefähr zu einem Viertel des PHA-Einbaues. Der Stimulationsindex zeigte bei PHA 115, bei Con A 25, bei PWM 53. Die verwendeten Tonsillenzellen reagierten also ähnlich wie die bereits untersuchten.
Die mit dem Anti-T-Zellserum behandelten Zellen blieben in ihrer Stimulierbarkeit um etwa ein Drittel hinter den unbehandelten Zellen zurück, sowohl bei PHA, Con A, als auch bei PWM (beide Verdünnungen des Anti-T-Zellserums unterschieden sich nur geringfügig in ihren Ergebnissen). Beim Stimulationsindex ergab sich für die mit Anti-T-Zellserum behandelten Zellen ein Wert, der über dem der unbehandelten Zellen lag. PHA (unbehandelt:behandelt mit 1:5 verdünntem Anti-T-Zellserum:behandelt mit 1:2o verdünntem Anti-T-Zellserum) 115:138:13o; Con A 26:28:35; PWM 53:7O:68.
Die mit Komplement behandelten Zellen erbrachten im Vergleich den niedrigsten Thymidineinbau und ebenso den niedrigsten Stimulationsindex (außer bei PWM, wobei der Stimulationsindex etwas über dem der unbehandelten Zellen lag).
Offensichtlich war es nicht gelungen, die T-Lymphozyten vollständig mit dem Anti-T-Zellserum zu entfernen, sonst hätten die mit PHA und Con A stimulierten Fraktionen einen erheblich niedrigeren

[illegible] T-Zell-Serum behan-
[illegible] Proliferation der T-Zellen



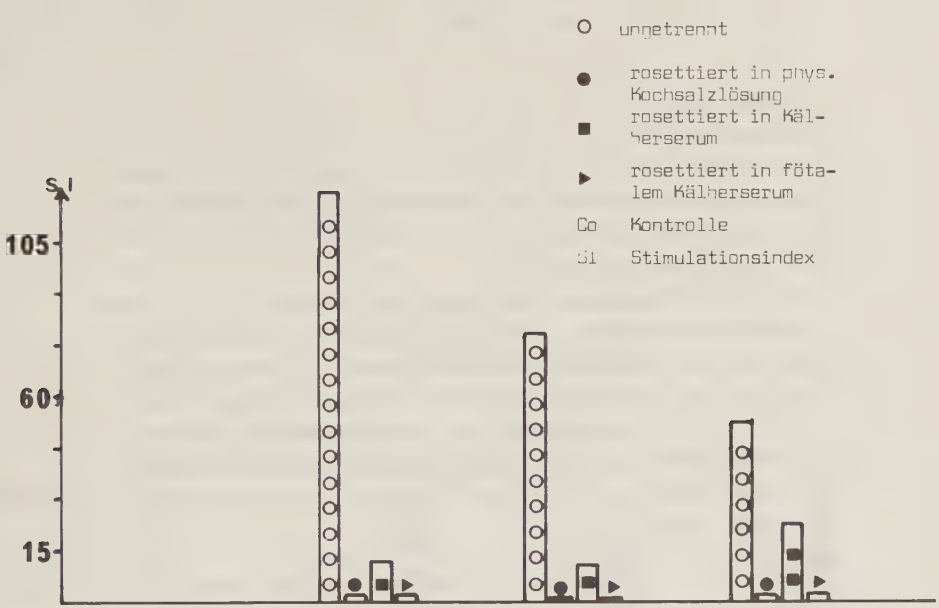
^{3}H-Thymidineinbau zeigen müssen als vor der Behandlung, da diese beiden Mitogene hauptsächlich auf T-Lymphozyten wirken. Deshalb wurde eine Abtrennung der T-Lymphozyten durch die sogenannte Rosettierung versucht.

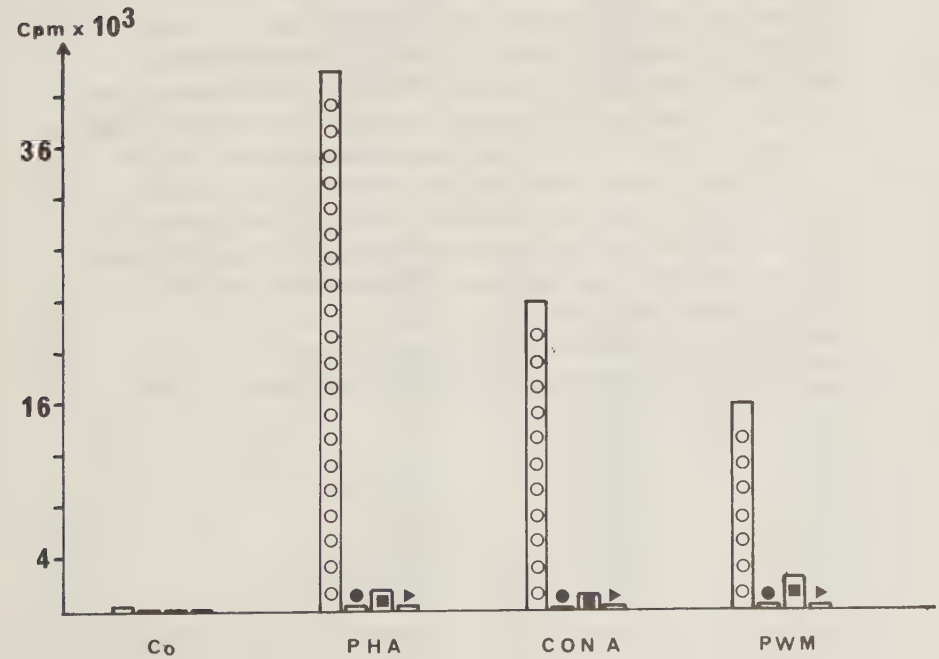
2.2. Abtrennung von T-Lymphozyten durch spontane Rosettenbildung mit Schaferythrozyten (9)

Zunächst wurde untersucht, in welchem Medium die höchste Zellausbeute zu erreichen war. Rosettiert wurde in physiologischer Kochsalzlösung, in Kalbs-Serum und in fötalem Kälberserum. Die Zellausbeute betrug im Allgemeinen zwischen zehn und zwölf Prozent der eingesetzten Zellen. Das beste Ergebnis brachte die Rosettierung in 1o % fötalem Kälberserum, so daß bei den weiteren Rosettierungsversuchen nur noch fötales Kälberserum verwendet wurde. Setzt man voraus, daß Tonsillen etwa 5o % B-Lymphozyten enthalten (28), so gehen bei der Rosettierung zwischen 75 % und 8O % der B-Lymphozyten (falls die Trennung geglückt ist) verloren. Als Vergleichswert wurden wiederum ungetrennte Kulturen verwendet. Ihr Verhalten war analog den bisher getesteten Tonsillenzellen (siehe Abbildung 3).
Bei der getrennten Fraktion zeigte sich, daß die nach der Rosettierung übriggebliebenen Zellen sich kaum stimulieren ließen. Die in physiologischer Kochsalzlösung, bzw. in fötalem Kälberserum rosettierten Zellen ergaben einen Stimulationsindex von weniger als 3-4. Dagegen zeigten die im Kälberserum rosettierten Zellen mit PWM einen Stimulationsindex von bis zu 22. Bemerkenswert erscheint, daß dieses Mitogen, das den niedrigsten Thymidineinbau bei der ungetrennten Fraktion zeigt (und ebenso den niedrigsten Stimulationsindex), den höchsten Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex nach der Trennung aufweist. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Berichten, daß PWM als einziges von den drei Mi-

Abbildung 2

Rosettierung in verschiedenen Medien





togenen auch B-Lymphozyten stimuliert - wenngleich nur in relativ geringem Maß (23).

Der Grund für die größere Proliferationsfähigkeit der mit Kalbsserum getrennten Zellen liegt wahrscheinlich darin, daß Kalbsserum bessere Bedingungen für das Überleben der Zellen bei der Rosettierung gewährleistet.

Die weiteren Trennungsversuche wurden nun nur mehr in 1o % fötalem Kälberserum vorgenommen. Dabei kristallisierten sich zwei verschiedene Versuchsergebnisse heraus: (siehe Abbildungen 4 und 5)

1. Tonsillen, die nach der Abtrennung der T-Lymphozyten einen erhöhten ^{3}H-Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex zeigten.
2. Tonsillenzellen, die nach der Abtrennung der T-Lymphozyten einen erniedrigten Einbau von ^{3}H-Thymidin, bzw. Stimulationsindex zeigten.

zu 1: Tonsillenzellen, die nach der Trennung einen höheren ^{3}H-Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex zeigten als vorher:

a) dies wurde beobachtet, wenn bei den ungetrennten Zellen Con A den höchsten Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex zeigte. Diese Versuchsbedingung war bisher noch nicht aufgetreten. Bisher hatte in allen Versuchen PHA am höchsten stimuliert,
b) die CPM waren weit niedriger als diejenigen bei den anderen Versuchen (unter 5.ooo), der Stimulationsindex blieb unter 8o,
c) nach der Trennung zeigten alle drei Mitogene einen erhöhten ^{3}H-Thymidineinbau - am wenigsten erhöht Con A, das ungetrennt den höchsten Thymidineinbau gehabt hatte, am höchsten PWM, das vor der Trennung den niedrigsten Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex gezeigt hatte,
d) PHA und PWM stiegen nach der Trennung auf mindestens das Doppelte an Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex an (PWM auf das 4,5-fache).

Abbildung 4

Vergleich unrosettierter und rosettierter Tonsillenzellen

Co Kontrolle

○ ungetrennt

● rosettiert

SI Stimulationsindex

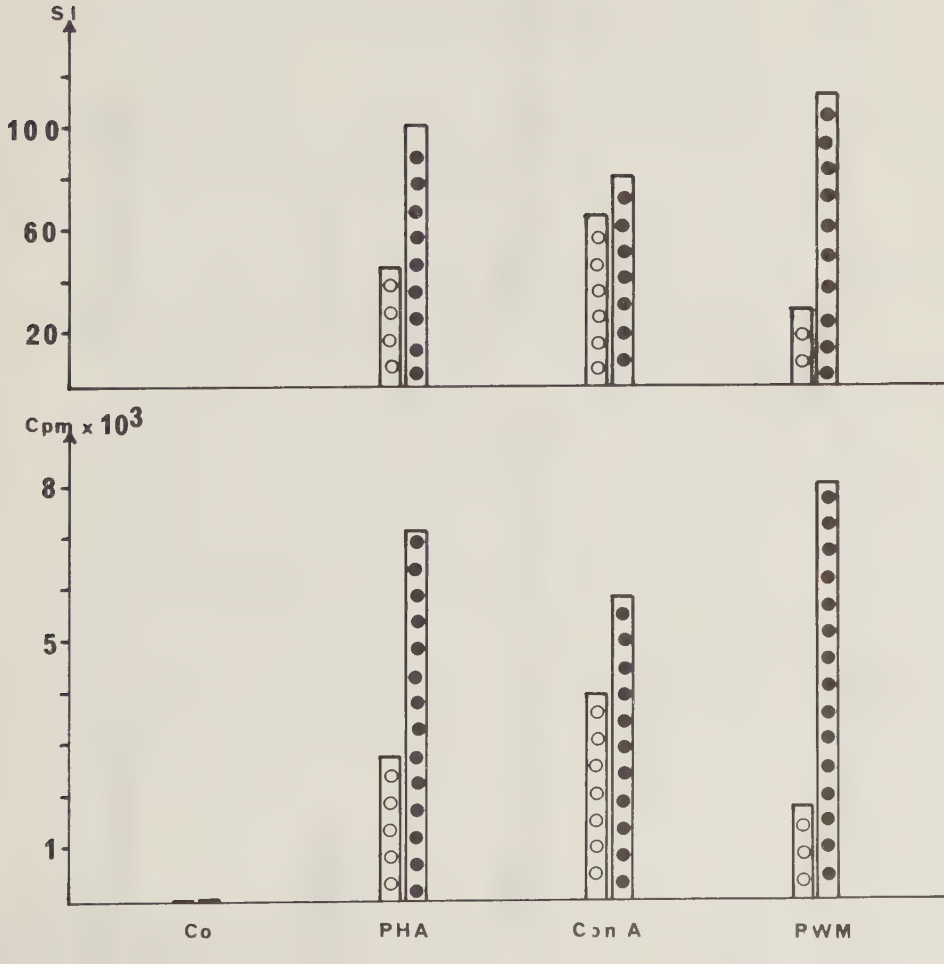
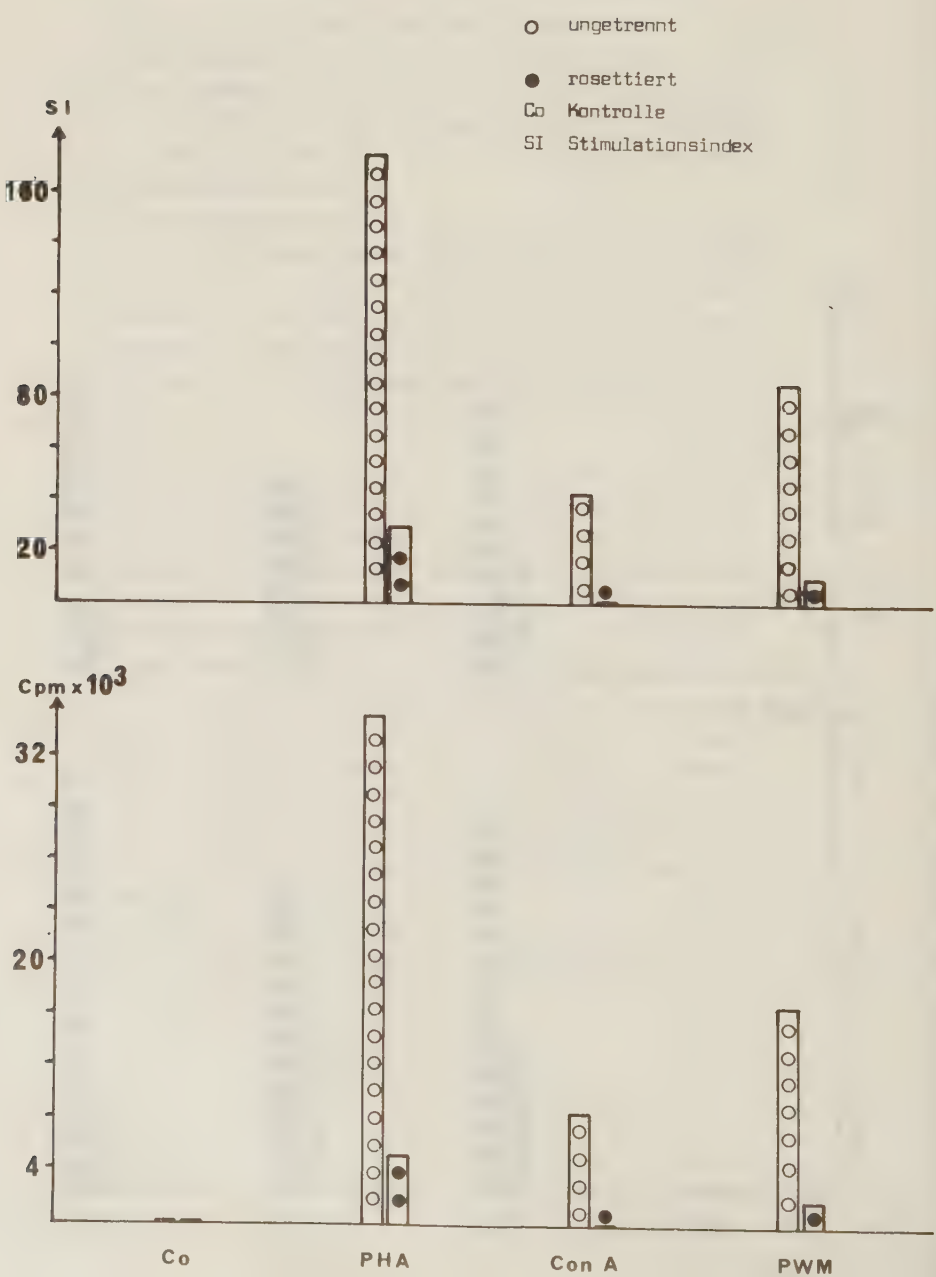


Abbildung 5

Vergleich unrosettierter und rosettierter Tonsillenzellen



zu 2: bei den Versuchen, die nach der Rosettierung einen erniedrigten ^{3}H-Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex aufwiesen, läßt sich Folgendes sagen:

a) der höchste Thymidineinbau folgte auf die PHA-Stimulation. Die CPM stiegen auf über 32.000, der Stimulationsindex lag bei über 170,
b) die Stimulation durch Pokeweed Mitogen lag sowohl im Thymidineinbau, als auch beim Stimulationsindex etwa halb so hoch wie diejenige mit PHA,
c) die Stimulation durch Concanavalin A lag sowohl im Thymidineinbau, als auch im Stimulationsindex wiederum bei der Hälfte von PWM,
d) nach der Rosettierung reduzierten sich Thymidineinbau sowie Stimulationsindex bei PHA und PWM auf Werte, die weniger als ein Fünftel der Ausgangswerte ausmachten,
e) bei Con A gingen die Werte auf den Nullwert zurück.

Mit diesen Ergebnissen zeigte sich, daß es in menschlichen Tonsillen zumindest zwei grundsätzlich verschiedene Populationen von Zellen gibt, die auf die Mitogene PHA, Con A und PWM unterschiedlich reagieren. Diese differente Reaktionsweise läßt sich sowohl im ungetrennten, als auch im getrennten Zustand verfolgen. Es wurden nun parallel zu den mitogenstimulierten und rosettierten Zellen wiederum Röhrchenkulturen nach Dosch und Gelfand angelegt mit Zellen aus denselben Tonsillen. Zu einem Teil der Röhrchenkulturen gab man am 4. Tag nach Ansatz TRF zu den rosettierten Zellen. Kurz vorher war bekannt geworden (24), daß hemmende Faktoren in Humanseren durch Absorption mit Schaferythrozyten entfernt werden konnten. Die mit Mitogen behandelten Zellen zeigten die unter 2 beschriebenen Ergebnisse, in den Röhrchenkulturen fanden sich keinerlei Plaques, weder in den ungetrennten, noch in den getrennten, noch in den getrennten und mit TRF behandelten Kulturen.

DISKUSSION

Lymphozyten sind die Träger der körpereigenen Abwehr der Vertebraten. Ihre Population läßt sich unterscheiden in sogenannte T-Lymphozyten (T als Abkürzung für Thymus, in dem sie ihre entscheidende Prägung erfahren) und B-Lymphozyten (B für bursa fabrici, einem Organ im Darmbereich der Vögel, bzw. einem analogen, noch nicht sicher identifizierten Ort bei anderen Organismen, in dem B-Lymphozyten ihre Charakteristik erhalten). B-Lymphozyten werden nach Antigen-Kontakt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Bei einer Reihe von Antigenen nun benötigen B-Zellen, um Plasmazellen zu werden, die Hilfe einer Subpopulation der T-Zellen, der sogenannten T-Helfer-Zellen.
Schimpl und Wecker wiesen im nu/nu-Maussystem nach, daß T-Helferzellen einen antigenunspezifischen Faktor produzieren, der die T-Zell-Funktion ersetzen kann, der von ihnen so genannte T-cell replacing factor (TRF) (5,6). Dieser Faktor gibt das letzte Signal für bereits proliferiert habende B-Zellen, das sie zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen macht (7).
Schimpl und Wecker wiesen den T-cell-replacing factor im Maussystem nach. In einer weiteren Arbeit ging es darum, die TRF-Wirkung im Humansystem nachzuweisen (21). Dazu wurden Tonsillenzellen verwendet. Die Tonsillen stammten von 3-7 jährigen Kindern, die nach medizinischer Indikation tonsillektomiert worden waren. Die Problematik dieser Versuch lag darin, daß sie wegen der bei jedem Versuch unterschiedlichen Zellpopulationen nicht reproduzierbar waren. Der hemmende Einfluß schien auf die bei jeder Tonsille vorhandenen Suppressor-Zellen zurückzuführen zu sein. T-Suppressor-Zellen wirken entweder auf T-Helfer-Zellen oder auf B-Zellen und unterdrücken so die Antikörper-Synthese.
Es sollte nun versucht werden, Wege zu finden, um das Versuchssystem mit Tonsillen-Zellen reproduzierbarer zu machen.
Verwendet wurden genauso wie in den vorausgegangenen Versuchen

Tonsillen von kleinen Kindern. Menschliche Tonsillen enthalten etwa gleichviel B- und T-Zellen. Von den B-Zellen sind etwa 26 % IgA-Träger, was sich durch die anatomische Lage der Tonsillen am Eingang des Magen-Darm-Traktes ohne weiteres erklärt (28). Die T-Zellen unterteilen sich in Suppressor-Zellen, cytotoxische und Helfer-Zellen.

Zunächst wurden Röhrchenkulturen nach Dosch und Gelfand (1) angelegt und die Zellen dann anschließend nach dem Jerne-Plaque-Test ausgetestet (2). Dabei konnten keinerlei reproduzierbare, antigenabhängige Ergebnisse erzielt werden. Die Problematik lag offensichtlich in den verwendeten Humanseren. Nur ein einziges erwies sich als verwendbar, doch ergab auch bei diesem Serum nicht jede Tonsille Plaques. Einige andere Seren erbrachten Pseudoplaques (3), andere wiederum überhaupt keine Ergebnisse. Anscheinend befand sich zumindest in einigen Seren ein oder mehrere Hemmfaktoren, die es nicht zur Antikörper-Synthese oder -Sezernierung kommen ließen. Der zweite Hemm-Mechanismus lag anscheinend in den Tonsillen-Zellen selbst, da sich mit einem der verwendeten Seren zumindest in einem Teil der Fälle Plaques produzieren ließen.

Deshalb wurde mit den Tonsillenkulturen zunächst ein anderer Weg beschritten: die Stimulation mit Mitogenen. Verwendet wurden die Mitogene Phytohämagglutinin, Concanavalin A, sowie Pokeweed Mitogen. Mitogene bringen Zellen zur Proliferation. Im Gegensatz zu Antigenen, die jeweils bestimmte Zellen stimulieren und somit zu einzelnen Klonen auswachsen lassen, wirken Mitogene auf viele Zellen gleichzeitig, die sich jeweils wiederum zu Klonen entwikkeln. Man bezeichnet dies als die polyklonale Wirkung der Mitogene.

Keines der drei Mitogene wirkt spezifisch auf nur eine der beiden Zellpopulationen - wobei sich die Forschungsergebnisse z.T. widersprechen (10), doch scheint ein Überwiegen der T-Zell-Stimulation vorzuliegen, wobei Con A und PHA zuerst T-Zellen akti-

vieren und die dann aktivierten T-Zellen wiederum auf die B-Zellen fördernd oder hemmend wirken (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 25, 26, 27, 28, 30). Nur PWM hat auch einen direkten Effekt auf die B-Zellen. Sowohl PHA als auch Con A aktivieren Zellen, die eine Hemmung auf Lymphozytenkulturen ausüben (16, 17, 18, 19, 26, 27). Beide aktivieren aber auch Zellen, die helfende Funktion besitzen (18). Con A bewirkt auch die Produktion des T-cell-replacing factors. Vermutlich wirken PHA und Con A sowohl auf T-Helfer wie auf T-Suppressor-Zellen - wenngleich in verschiedenem Maß.

Bei den untersuchten Tonsillenzellen wurde als Ausdruck der DNA-Syntheserate der Einbau von radioaktivem Thymidin gemessen. Es erwiesen sich fast alle der getesteten Tonsillen als stimulierbar. Phytohämagglutinin ergab bei allen Versuchen jeweils die höchste Einbaurate. Zeitlich gesehen erreichte die DNA-Synthese ein Maximum am 4. Tag und sank dann in etwa linear ab, um am 6. Tag bei etwa 75 % des Wertes des vierten Tages zu liegen. Der Stimulationsindex allerdings stieg vom vierten zum sechsten Tag an. Wahrscheinlich ist dies auf eine allgemeine Kulturverschlechterung im Laufe der Zeit zurückzuführen, die Zerfallsprodukte hemmen die DNA-Synthese, obwohl mehr Zellen am 6. Tag zu proliferieren schienen (siehe Abbildung 1).

Concanavalin A führte zu einem ^{3}H-Thymidineinbau, der nur knapp die Hälfte des Wertes von PHA erreichte. Con A stimulierte genau wie PHA die Zellen am 4. Tag am höchsten und fiel ebenso bis zum 6. Tag ab. Der Stimulationsindex allerdings - im Gegensatz zu PHA - fiel ebenfalls vom vierten auf den sechsten Tag.

Pokeweed Mitogen hatte eine andere Kinetik. Es lag am vierten Tag ebenso hoch wie Con A, stieg aber am 5. Tag noch an und erreichte damit den höchsten Thymidineinbau und blieb am 6. Tag knapp auf der Höhe des 5. Tages. Der Stimulationsindex lag am Tag 4 bei 22, stieg am 5. Tag auf 35 und erreichte am 6. Tag 49. Alle drei Mitogene hatten also eine unterschiedliche Kinetik.

Setzt man voraus, daß T-Zellen eine ähnliche Proliferationskinetik nach Stimulation mit den verschiedenen Mitogenen besitzen, so ließe sich der Thymidineinbaupeak am 4. Tag von PHA und Con A erklären, da beide hauptsächlich auf T-Zellen wirken. Daß es sich dabei um verschiedene Subpopulationen handelt (bzw. eine andere Art der Stimulationsinduktion), dafür würde sprechen, daß PHA höher liegt und der Stimulationsindex bei PHA noch ansteigt, während er bei Con A sinkt. Möglicherweise spielen auch Makrophagen hier ein Rolle.

Auch das PWM-Ergebnis könnte in diese Richtung deuten. Wenn die B-Zellen mit Hilfe der T-Zellen bei PWM-Stimulation besser proliferieren, so könnte es sein, daß die früher proliferierenden T-Zellen nach einigen Tagen B-Zellen zur vermehrten Proliferation treiben und im späteren Zeitraum der Kultur die nun stärker proliferierenden B-Zellen zusammen mit den T-Zellen zu einem erhöhten Thymidineinbau, bzw. Stimulationsindex führen. Das Absinken am 6. Tag beim Thymidineinbau könnte wiederum auf eine Kulturverschlechterung durch abgestorbene Zellen, bzw. Ausscheidungsprodukte zurückzuführen sein (23).

Bei den Versuchen wurde Humanserum im Medium mitverwendet. Offensichtlich hatte es keinen blockierenden Effekt. Dies läßt nun folgende Deutung zu: entweder wirken Mitogene grundsätzlich anders als Antigene und werden deshalb von der Blockierung im Serum nicht beeinflußt, oder aber die Blockierung bei den Röhrchenkulturen lag in einem späteren Zeitpunkt der Kultur, d.h. zwischen Zellproliferation und Antikörperproduktion bzw. Antikörpersezernierung. Es klingt nicht sehr wahrscheinlich, daß die Blockierung bei der antigengetriebenen Proliferation liegen sollte. Sonst wäre zu folgern, daß diese Blockierung auch beim Spender des Serums liegen müßte, d.h. daß im Serum befindliche Faktoren SRBC-empfindliche B-Zellen lähmen würden. Der (oder einer der) Spender müßte dann unfähig sein, Antikörper auf SRBC zu produzieren.

Somit deuten die Stimulationsversuche eher darauf hin, daß der Hemmechanismus bei den nach Dosch und Gelfand angesetzten Kulturen in einer sich nach der Proliferationsphase befindlichen Phase finden muß. Ob es sich bei dieser Hemmung um das verwendete Serum, um T-Suppressor-Zellen, um beide kombiniert oder noch um zusätzliche, unbekannte Faktoren handelt, das kann von den bisherigen Stimulationsversuchen in Kombination mit den Röhrchenversuchen nicht mit Sicherheit gesagt werden.
Nachdem gezeigt worden war, daß mehr oder weniger alle verwendeten Tonsillenzellen durch die Mitogene PHA, Con A und PWM stimulierbar waren, wurde versucht, durch verschiedene Methoden die T-Zellen abzutrennen, um zu reinen B-Zell-Kulturen zu kommen. Dabei mußte man theoretisch voraussetzen, daß eine Abtrennung der T-Zellen bei allen drei Mitogenen einen Rückgang sowohl im ^{3}H-Thymidineinbau, als auch im Stimulationsindex verursachen würde. Zwei der Mitogene wirken hauptsächlich nur auf die T-Lymphozyten. PWM stimuliert zwar auch die B-Lymphozyten, das Maß dieser Stimulation ist aber wiederum von der Anwesenheit der T-Lymphozyten abhängig, so daß ohne T-Zellen nur eine geringere - wenngleich vorhandene - B-Zell-Stimulation zu verzeichnen wäre. Als Indiz zu diesem Modell konnte gelten, daß wenn bei den ungetrennten Kulturen ein Überwiegen der Suppressor-Aktivität zu erkennen war (möglicherweise durch Con A angezeigt) es nach der Trennung einen erhöhten B-Zell-response geben würde.
Sollte aber der ^{3}H-Thymidineinbau nach T-Elimination gegen Null zurückgehen, so stellte sich die Frage, ob die Zellen nicht durch die lange Prozedur der Trennungstechniken schon so geschädigt sein würden, daß sie nicht mehr fähig wären zu proliferieren - und somit nur eine scheinbare T-Abtrennung erfolgt wäre.
Bei den Trennungsversuchen wurde zuerst die Elimination der T-

Zellen durch ein Anti-T-Zell-Serum in einer Verdünnung von 1:5, bzw. 1:2o versucht. Dabei ging der Thymidineinbau zwar um etwa die Hälfte zurück, doch zeigte der Vergleich mit dem Stimulationsindex (siehe Abbildung 2), daß dieser über den der ungetrennten Zellfraktion anstieg. Nur die mit Komplement behandelten Zellen lagen sowohl im Thymidineinbau, als auch im Stimulationsindex unter der ungetrennten Fraktion.
Das Ergebnis zeigt, daß wohl ein Teil der T-Zellen entfernt wurde, daß es sich dabei aber bei weitem nicht um alle handelte (auch der Thymidineinbau bei PWM ging zurück). So erschien diese Methode, T-Zellen abzutrennen, als nicht brauchbar.
So ging man über zu Rosettierung. Als erstes wurden die Rosettierungsergebnisse in physiologischer Kochsalzlösung, in Kälberserum und in fötalem Kälberserum untersucht. Die Zellausbeute an nicht-rosettierten Zellen (also hauptsächlich B-Zellen) erwies sich bei allen drei Ansätzen als fast gleich hoch bei etwa 1o % der eingesetzten Zellen, so daß - wenn man voraussetzt, daß Tonsillen etwa zur Hälfte aus B-Lymphozyten und zur anderen Hälfte aus T-Lymphozyten bestehen (28) - etwa 8o % der B-Lymphozyten verlorengingen. Fötales Kälberserum brachte eine etwas höhere Ausbeute an B-Zellen, so daß anschließend nur noch in FCS rosettiert wurde.
Als Ergebnis der Stimulation zeigte sich, daß die Werte der in physiologischer Kochsalzlösung und in fötalem Kälberserum rosettierten Zellen in der Nähe des Kontrollwertes lagen, während die in Kälberserum rosettierten Zellen etwas höher lagen (siehe Abbildung 3). Setzt man voraus, daß die Zellen die Trennung unbeschadet überlebten (wofür die noch vorhandene Stimulationsfähigkeit bei den im Kälberserum rosettierten Zellen spricht), so erscheint bemerkenswert, daß - wenngleich nur angedeutet - die mit PWM stimulierten getrennten Kulturen (am deutlichsten bei Kälberserum) am besten noch stimuliert werden konnten, während sie vor der Trennung noch den niedrigsten Wert zeigten. Womöglich ist

also hier eine Abtrennung der T-Zellen geschehen, vor allem, da PHA und Con A, die T-Zell-spezifischen Mitogene, weit weniger Einbau zeigten als die mit PWM stimulierten, getrennten Kulturen. Vielleicht aber sind durch die Trennung auch zuviele Makrophagen verlorengegangen.

Die weiteren Rosettierungsversuche zeigten zwei grundsätzlich unterschiedliche Ergebnisse:

a) in einem geringeren Teil der Versuche trat nach der Trennung ein gesteigerter ^{3}H-Thymidineinbau und ein erhöhter Stimulationsindex auf,

b) beim größeren Teil der Versuche fiel der Thymidineinbau und der Stimulationsindex wesentlich ab nach der Trennung.

Bei genauerer Untersuchung fand man folgende unterschiedliche Kriterien für die beiden Versuchsergebnisse (siehe Abbildungen 4 und 5):

zu a) Con A führte im ungetrennten Zustand zum höchsten Thymidineinbau und Stimulationsindex. Die Einbaurate war allerdings verhältnismäßig niedrig (unter 4.000 cpm, der Stimulationsindex unter 80). Am niedrigsten lag PWM mit unter 2.000 cpm (Stimulationsindex 30). Nach der Trennung aber zeigte PWM den höchsten ^{3}H-Thymidineinbau und den höchsten Stimulationsindex - counts und Stimulationsindex waren mehr als viermal so hoch im Vergleich zu den ungetrennten Zellen,

zu b) PHA führte im ungetrennten Zustand zum höchsten Thymidineinbau und Stimulationsindex (genauso wie in den vorher beschriebenen, ungetrennten Zell-Versuchen). Die Thymidineinbaurate war hoch, ebenso der Stimulationsindex (32.000 cpm, Stimulationsindex bei 170). Con A zeigte ungetrennt den niedrigsten ^{3}H-Thymidineinbau, getrennt ging es auf den Kontrollwert zurück. Die getrennten, mit PHA, bzw. PWM stimulierten Zellen zeigten einen Stimulationsindex von etwa 30 bei PHA und 10 bei PWM.

Dazu läßt sich wohl Folgendes feststellen: bei a) handelte es

sich um eine grundsätzlich anders zusammengesetzte Zellpopulation von Tonsillenzellen als bei b). Die Zellen ließen sich am besten von Con A stimulieren, wenngleich insgesamt weit geringer als die bei b) aufgeführten Zellen. Damit scheint gezeigt zu sein, daß menschliche Tonsillenzellen interindividuell sehr verschieden zusammengesetzt sind. Das mag auf genetische oder durch Immunprozesse verursachte Unterschiede zurückzuführen sein.
Bei den unter a) aufgeführten Zellen scheint ein Überwiegen der Suppressor-Funktion vorhanden zu sein, da vor allem B-Zellen nach der Trennung um das Mehrfache besser stimulierbar waren. Dies findet sich in Übereinstimmung mit der Literatur, wonach Con A mehr Suppressor-Zellen stimuliert (16, 17, 18). Sowohl Con A als auch PHA zeigten nach der Trennung eine höhere ^{3}H-Thymidin-Einbaurate. Könnte dies ein Hinweis dafür sein, daß (nachdem beide nur auf T-Lymphozyten wirken) die abgetrennten Zellen eine hemmende Wirkung auf die nichtabgetrennten Zellen hatten, d.h. daß T-Suppressor-Zellen zumindest auch andere T-Zellen hemmen? Am höchsten ließen sich nach der Trennung die durch PWM stimulierten Zellen zum Thymidineinbau treiben. Das zeigt, daß hier entweder hauptsächlich nur B-Zell-Kulturen vorhanden waren oder B-Zellen mit T-Helfer-Zellen. Ob aber mit Sicherheit nur noch B-Zellen vorhanden waren, das läßt sich nicht exakt sagen.
Bei b) scheint ein Großteil der T-Zellen entfernt zu sein. Wiederum läßt sich sagen, daß PHA und Con A anscheinend überwiegend andere Zellpopulationen stimulieren - diesmal hatte Con A ungetrennt die niedrigste Proliferationsrate. Die getrennte Fraktion ließ sich von Con überhaupt nicht mehr stimulieren. Damit scheint es, daß alle von Con A stimulierbaren Zellen entfernt waren. PHA stimulierte die abgetrennte Fraktion noch bis zu einem Stimulationsindex von 30. Erneut ein Hinweis dafür, daß PHA und Con A entweder eine andere Zellpopulation oder auf einem anderen Weg (z.B. mit Hilfe der B-Zellen bei PHA) stimulieren.

Man ging nun daran, nachdem es geglückt schien, in einem Teil der Versuche eine genügende Abtrennung von T-Lymphozyten erreicht zu haben, parallel zu Mitogen-Stimulationsversuchen Röhrchenkulturen anzulegen. Inzwischen war bekannt geworden (24), daß hemmende Faktoren in Humanseren durch Absorption mit Schaferythrozyten entfernt werden konnten.
Versuche mit zwei verschiedenen Tonsillenpaaren zeigten ein Verhalten wie in Abbildung 5 gezeigt. Die Zellkulturen brachten kein Ergebnis, weder mit ungetrennten Zellen, noch mit rosettierten Zellen, noch mit rosettierten und am 4. Tag mit TRF versehenen Zellkulturen.
Als Ursache der Blockierung lassen sich wiederum die zwei bereits bekannten Faktoren ins Feld führen: einerseits könnte - trotz der Absorption mit Schaferythrozyten - das verwendete Serum die Hemmung bewirkt haben, andererseits lag die Hemmung möglicherweise bei den nicht abgetrennten Suppressor-Zellen. Eine weitere, mögliche Ursache könnte auch sein, daß man ein Tonsillenpaar bräuchte, das sich wie die in Abbildung 4 gezeigte Zellpopulation verhielte. Solcherart zusammengesetzte Tonsillenzellpopulationen scheint es nach den Versuchsergebnissen bei menschlichen Tonsillen nur bis zu 2o % zu geben.

Damit stellt sich die Frage nach der Eignung des Tonsillensystems zum Nachweis des T-cell replacing factors. Das Hauptproblem dieses Systems liegt - wie es sich zeigte - an der mangelnden Reproduzierbarkeit. Erschien es nach der Arbeit von Glöckner (21), daß deren Ursache vor allem in den Suppressor-Zellen läge, so zeigte sich jetzt, daß es einen weiteren Hemm-Mechanismus im Serum gibt. Beide Hemm-Mechanismen konnten nicht zuverlässig eliminiert werden.
Am problematischsten erscheint, daß bei jedem Versuch ein anderes Ausgangsmaterial verwendet werden mußte. Die Stimulationsversuche zeigten deutlich, daß es beim Menschen zumindest zwei

grundsätzlich verschiedene Tonsillenpopulationen gibt, die sich ganz verschieden verhalten. Außerdem ließ sich mit Hilfe der Mitogenstimulation nicht mit Sicherheit sagen, ob eine Abtrennung von T-Lymphozyten vollständig erfolgte oder nicht. Hinzu kommen genetische und krankheitsspezifische Unterschiede bei den einzelnen Tonsillenspendern. Weiterhin handelte es sich bei dem Versuchsmaterial um Tonsillen, die entfernt werden mußten, d.h. die pathologisch verändert waren.
Um Ergebnisse vergleichen zu können, benötigt man möglichst identisches Ausgangsmaterial. Das ist bei humanen Tonsillen nicht gegeben. Außerdem ist ihre Zellzahl zu gering, um damit mehrere Versuche machen zu können.
Humanmilzen bieten den nötigen großen Pool an Ausgangsmaterial. Nachdem es gelang, eingefrorene Zellen am Leben und proliferationsfähig zu erhalten, ist dieser Ansatz weit erfolgversprechender und erfolgreicher (31) als das Tonsillensystem, um den T-cell replacing factor im menschlichen System nachzuweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde versucht, ein reproduzierbares System von humanen Tonsillenzell-Kulturen zu errichten zum Nachweis des T-cell replacing factors. Dabei erwies es sich als nicht möglich, die verschiedenen Hemmfaktoren zuverlässig zu eliminieren. Es zeigte sich, daß zumindest zwei Hemmechanismen im Spiele waren, von denen der eine im verwendeten Humanserum und ein weiterer in den T-Suppressor-Zellen zu suchen ist. Weiterhin fand sich, daß menschliche Tonsillenzellpopulationen sehr heterogen sind und sich bei Stimulationsversuchen ganz unterschiedlich verhalten. Somit kann nicht von einem einheitlichen Ausgangsmaterial gesprochen werden. Es konnte nie mit Sicherheit gesagt werden, ob eine genügende Trennung von T- und B-Lymphozyten erfolgt war. Aufgrund der zu geringen Zellzahl in den jeweiligen Tonsillen war eine Wiederholung von Versuchen, bzw. Versuchsvarianten mit Zellen der gleichen Tonsille nicht möglich.
Damit erscheint das Tonsillenmodell als Nachweissystem für den T-cell replacing factor nicht geeignet.

Literatur

(1) Dosch H.M., Gelfand E.W., J. Immunol. 118, 302 (1977): Generation of Human plaque-forming cells in culture: tissue distribution, antigenic and cellular requirements.

(2) Jerne N.K., Nordin A.A., Science (Wash.D.C., 140, 405 (1963): Plaque formation in agar by single antibody producing cells in vitro.

(3) Muchmore A.V., Koski J., Dooley N., Blaese R.M., J. Immunol. 116, 1016 (1976): Artefactual plaque formation in vitro and in vivo due to passive transfer of specific antibody.

(4) Galili U., Schlesinger M., J. Immunol. 112, 1628 (1974): The formation of stable E-rosettes after neuraminidase-treatment of either Human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells.

(5) Schimpl A., Wecker E., Nature (New. Biol.) 237, 15 (1972): Replacement of T-cell function by a T-cell factor.

(6) Askonas B.A., Schimpl A., Wecker E., Eur.J.Immunol. 4, 164 (1974): The differentiation function of T-cell replacing factor in nu/nu spleen cultures.

(7) Schimpl A., Wecker E., Transplantation Reviews 23, 176 (1975): A third signal in B-cell activation given by TRF.

(8) Gershon R.K., Cohen Ph., Hencin D., Liebhaber A., J. Immunol. 108, 586 (1972): Suppressor T-cells.

(9) Greaves M.F., Brown G., J. Immunol. 112, 420 (1974): Purification of Human T and B lymphocytes.

(10) Philipps B., Roit I., Nature (New. Biol.) 241, 254 (1970): Evidence for transformation of Human B lymphocytes by PHA.

(11) Schmittke J.R., Njaran J.S., J. Immunol. 114, 742 (1975): Synergistic effects on DNA-synthesis of Phytohemagglutinin

or Concanavalin A and Lipopolysacharide in Human peripheral blood lymphocytes.

(12) Keightley R., Cooper M., Lawton A., J. Immunol. 117, 1538 (1976): The T-cell dependence of B-cell differentiation induced by PWM.

(13) Bertheim J., Dorian R., Mendelsohn J., J. Immunol. 12o, 955 (1978): DNA-synthesis and proliferation of Human lymphocytes in vitro. I. Cell kinetics of response to phytohemagglutinin.

(14) Hirano T., Kuritani T., Kishimoto T., Yamamura Y., J. Immunol. 119, 1235 (1977): In vitro immune response of Human peripheral lymphocytes. I The mechanism involved in T-cell helper-function in the PWM-induced differentiation and proliferation of B-cells.

(15) Maca, Bonnard, Herberman, J. Immunol. 123, 246 (1979): The suppression of mitogen and alloantigen-stimulated peripheral blood lymphocytes by cultured Human T-lymphocytes.

(16) Shou L., Schwartz St., Good R., J.Ex.Medicine 143, 11oo (1976): Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors.

(17) Sakane T., Green I., J. Immunol. 119, 1169 (1977): Human suppressor T-cells induced by Concanavalin A: Suppressor T-cells belong to distinctive T-cell subclass.

(18) Hynes B., Fauci A., J. Immunol. 118, 2281 (1977): Activation of Human B-Lymphocytes. III. Concanavalin A-induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal Human B-Lymphocytes.

(19) Swain R.W., Dutton, J. Immunol. 124, 437 (1979): Production of Con-A-induced Helper T-cell replacing factor requires a T-cell and an Ia-positive non-T-cell.

(2o) Chess L., Mac Dermott R., Schlossman St., J. Immunol. 113, 1113 (1974): Immunologic functions of isolated Human lympho-

cyte subpopulations. I. Quantitative isolation of Human T and B-cells and response to mitogen.

(21) Glöckner W., In vitro Immunreaktion von menschlichen Tonsillenkulturen und Nachweis eines T-Zellen ersetzenden Faktors in diesem System.
Medizinische Doktorarbeit, verfaßt im Institut für Virologie und Immunologie in Würzburg (1977).

(22) Moretta L., Ferrarini M., Mingari M., Webb S., J. Immunol. 117, 2171 (1976): Subpopulations of Human T-cells identified by receptors for immunoglobins and mitogen responsiveness.

(23) Greaves M., Janossy G., Doenhoff M., J.Ex.Medicine 14o, 1 (1974): Selective triggering of Human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.

(24) Fauci A., Pratt K., J.Ex.Medicine 144, 674 (1976): Activation of Human B-lymphocytes. I. Direct plaque-forming cell assay for the measurement of polyclonal activation and antigenic stimulation of Human B-lymphocytes.

(25) Fauci A., Pratt K., Whalen G., J. Immunol. 117, 21oo (1976): Activation of Human B-lymphocytes. II. Cellular interaction in the PFC-response of Human tonsillar and peripheral blood B-lymphocytes to polyclonal activation by PuM.

(26) Haynes B., Fauci A., J. Immunol. 12o, 7oo (1978): Activation of Human B-lymphocytes. V. Kinetics and mechanisms of suppression of plaque-forming cell response by Concanavalin A generated suppressor cells.

(27) Winger L., Nowell P., Daniels R., J. Immunol. 118, 1768 (1977): Sequential proliferation induced in Human peripheral blood lymphocytes by mitogen. II. Suppression by PHA-activated cells.

(28) Delespesse G., Ducahteau J., Gausset Ph., Govaerts A., J. Immunol. 116, 437 (1975): In vitro response of subpopulations of Human tonsil lymphocytes. I. Cellular collaboration in the proliferation response to Phytohemagglutinin and Concanavalin A.

(29) Muraguchi A., Kishimoto T., Kuritani T., Watanabe T., Yamamura Y., J. Immunol. 125/2, 564 (1980): In vitro immune response of Human peripheral lymphocytes. V. PHA- and Protein A-induced Human B colony formation and analysis of the subpopulations of B-cells.

(3o) Schuurman R., Gelfand E., Dosch H.M., J. Immunol. 125/2, 82o (1980): Polyclonal activation of Human lymphocytes. I. Characterisation of the lymphocyte response to a T-cell independent B-cell mitogen.
II. Reappraisal of T- and B-cell specific mitogens.

(31) Homa Mohadjer-Djasbi, Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Universität Würzburg 1979: Entwicklung eines humanen in vitro Immunsystems zum Nachweis des T-Zell-ersetzenden Faktors.

Lebenslauf

1946	am 5.8. 1946 als drittes Kind von Sebastian und Theresia Merkle in Wolnzach/Hallertau/ Bayern geboren
1952 - 1960	Volksschule in Wolnzach und Friedberg/Bayern
1960 - 1963	Realschule in Augsburg
1963 - 1966	Banklehre bei der Bayerischen Hypotheken- und Wechsel-Bank, Zweigniederlassung Augsburg
1966 - 1969	Bayernkolleg Augsburg, 1969 Abitur
1969 - 1974	Studium der kath. Theologie an der Universität München
1974 - 1980	Studium der Medizin in München und Würzburg, Abschluß mit dem Dritten Staatsexamen im November 1980

Hans Merkle